

12/07/98

M.BORIN

Page 1

CAPLUS COPYRIGHT 1998 ACS

	PATENT NO.	KIND	DATE	APPLICATION NO.	DATE
PI	JP 08225594	A2	19960903	JP 95-72224	19950221
AN	1996:660972	CAPLUS			
DN	125:301610				
TI	New peptides from hydrolyzate of soy protein and their chemical synthesis as immunostimulants				
IN	Yamauchi, Fumio; Suetsuna, Kunio				
PA	Suetsuna Yoko, Japan				
SO	Jpn. Kokai Tokkyo Koho, 16 pp. CODEN: JKXXAF				
DT	Patent				
LA	Japanese				
IC	ICM C07K005-103 ICS A61K038-00; C07K005-107; C07K007-06				
CC	34-3 (Amino Acids, Peptides, and Proteins) Section cross-reference(s): 1				

FAN.CNT 1

	PATENT NO.	KIND	DATE	APPLICATION NO.	DATE
PI	JP 08225594	A2	19960903	JP 95-72224	19950221
AB	Eight peptides, i.e. H-Phe-Thr-Lys-Pro-Gly-OH, H-Leu-Lys-Pro-Asn-OH, H-Phe-Gly-Pro-Gly-OH, H-Glu-Asp-Lys-Pro-Phe-Asn-Leu-OH, H-Ala-Glu-Ile-Asn-Met-Pro-Asp-Tyr-OH, H-Val-Ile-Pro-Pro-Gly-Val-Pro-Tyr-OH, H-Glu-Gln-Gln-Gly-Lys-Gly-OH, and H-Ser-Gly-Phe-Ala-Pro-OH, prepd. These peptides were prepd. by enzymic hydrolysis of homogenized soy beans in the presence of pepsin, filtration of the reaction mixt. through an ultrafiltration membrane, chromatog. purifn. using columns of Dowex 50W X4 [H+], Sephadex G-25, and SP-Sephadex C-25 [H+], and HPLC purifn. using a Develosil ODS-50 column. They were also prepd. by the solid-phase method using an Applied Biosystems peptide synthesizer 430A and Boc-protected amino acids. These 8 peptides in vitro showed significant mitogenic activity in mouse spleen cells.				
ST	peptide prepn hydrolyzate soy protein; immunostimulant peptide				
IT	Immunostimulants (new peptides from hydrolyzate of soy protein and their chem. synthesis as immunostimulants)				
IT	Peptides, preparation RL: BAC (Biological activity or effector, except adverse); BPN (Biosynthetic preparation); SPN (Synthetic preparation); THU (Therapeutic use); BIOL (Biological study); PREP (Preparation); USES (Uses) (new peptides from hydrolyzate of soy protein and their chem. synthesis as immunostimulants)				
IT	Proteins, reactions RL: RCT (Reactant) (soy bean; new peptides from hydrolyzate of soy protein and their				

09/039308

chem. synthesis as immunostimulants)
IT 147001-59-(165744-98-9P 165744-99-0P : '5-00-6P
165745-01-7L 165745-02-8P 165745-03-9P 16-26-3P
RL: BAC (Biological activity or effector, except adverse); BPN
(Biosynthetic preparation); SPN (Synthetic preparation); THU
(Therapeutic use); BIOL (Biological study); PREP (Preparation); USES
(Uses)
(new peptides from hydrolyzate of soy protein and their chem.
synthesis as immunostimulants)

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-225594

(43)公開日 平成8年(1996)9月3日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K 5/103	Z N A	8517-4H	C 0 7 K 5/103	Z N A
A 6 1 K 38/00	A B D		5/107	
C 0 7 K 5/107			7/06	
7/06			A 6 1 K 37/02	A B D

審査請求 有 請求項の数16 書面 (全 16 頁)

(21)出願番号 特願平7-72224

(22)出願日 平成7年(1995)2月21日

(71)出願人 591167119

末綱 陽子

山口県下関市川中本町16-14

(72)発明者 山内 文男

宮城県仙台市太白区桜木町31-11

(72)発明者 末綱 邦男

山口県下関市川中本町16-14

(54)【発明の名称】 新規なペプチドおよび免疫賦活剤

(57)【要約】

【目的】 大豆のタンパク質分解酵素の分解液から新規な免疫賦活作用を有する新規なペプチドを提供する。

【構成】 大豆をタンパク質分解酵素等で処理し、新規な免疫賦活作用を有する6種のペプチドは(1) Phe-Thr-Lys-Pro-Gly, (2) Leu-Lys-Pro-Asn, (3) Phe-Gly-Pro-Gly, (4) Glu-Asp-Lys-Pro-Phe-Asn-Leu, (5) Ala-Glu-Ile-Asn-Met-Pro-Asp-Tyr, (6) Val-Ile-Pro-Pro-Gly-Val-Pro-Tyr, (7) Glu-Gln-Gln-Gly-Lys-Gly-Ile, (8) Ser-Gly-Phe-Ala-Proであり、免疫賦活作用を有し、毒性も極めて低い。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 次式； Phe-Thr-Lys-Pro-Gly

で示されるL体のアミノ酸の配列によるペプチド構造を有する新規なペプチド。

【請求項2】 次式； Phe-Thr-Lys-Pro-Gly

で示されるL体のアミノ酸の配列によるペプチド構造を有する新規なペプチドを有効成分として含有することを特徴とする免疫賦活剤。

【請求項3】 次式； Leu-Lys-Pro-Asn

で示されるL体のアミノ酸の配列によるペプチド構造を有する新規なペプチド。

【請求項4】 次式； Leu-Lys-Pro-Asn

で示されるL体のアミノ酸の配列によるペプチド構造を有する新規なペプチドを有効成分として含有することを特徴とする免疫賦活剤。

【請求項5】 次式； Phe-Gly-Pro-Gly

で示されるL体のアミノ酸の配列によるペプチド構造を有する新規なペプチド。

【請求項6】 次式； Phe-Gly-Pro-Gly

で示されるL体のアミノ酸の配列によるペプチド構造を有する新規なペプチドを有効成分として含有することを特徴とする免疫賦活剤。

【請求項7】 次式； Glu-Asp-Lys-Pro-Phe-Asn-Leu

で示されるL体のアミノ酸の配列によるペプチド構造を有する新規なペプチド。

【請求項8】 次式； Glu-Asp-Lys-Pro-Phe-Asn-Leu

で示されるL体のアミノ酸の配列によるペプチド構造を有する新規なペプチドを有効成分として含有することを特徴とする免疫賦活剤。

【請求項9】 次式； Ala-Glu-Ile-Asn-Met-Pro-Asp-Tyr

で示されるL体のアミノ酸の配列によるペプチド構造を有する新規なペプチド。

【請求項10】 次式； Ala-Glu-Ile-Asn-Met-Pro-Asp-Tyr

で示されるL体のアミノ酸の配列によるペプチド構造を有する新規なペプチドを有効成分として含有することを特徴とする免疫賦活剤。

【請求項11】 次式； Val-Ile-Pro-Pro-Gly-Val-Pro-Tyr

で示されるL体のアミノ酸の配列によるペプチド構造を有する新規なペプチド。

2

【請求項12】 次式； Val-Ile-Pro-Pro-Gly-Val-Pro-Tyr

で示されるL体のアミノ酸の配列によるペプチド構造を有する新規なペプチドを有効成分として含有することを特徴とする免疫賦活剤。

【請求項13】 次式； Glu-Gln-Gln-Gly-Lys-Gly-Ile

で示されるL体のアミノ酸の配列によるペプチド構造を有する新規なペプチド。

10 【請求項14】 次式； Glu-Gln-Gln-Gly-Lys-Gly-Ile

で示されるL体のアミノ酸の配列によるペプチド構造を有する新規なペプチドを有効成分として含有することを特徴とする免疫賦活剤。

【請求項15】 次式； Ser-Gly-Phe-Ala-Pro

で示されるL体のアミノ酸の配列によるペプチド構造を有する新規なペプチド。

【請求項16】 次式； Ser-Gly-Phe-Ala-Pro

で示されるL体のアミノ酸の配列によるペプチド構造を有する新規なペプチドを有効成分として含有することを特徴とする免疫賦活剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、医薬として有用性を有する下記のアミノ酸の配列のペプチド構造を有するペプチドならびにそのペプチドを有効成分とする免疫賦活剤に関する。

30 (1) Phe-Thr-Lys-Pro-Gly

(2) Leu-Lys-Pro-Asn

(3) Phe-Gly-Pro-Gly

(4) Glu-Asp-Lys-Pro-Phe-Asn-Leu

(5) Ala-Glu-Ile-Asn-Met-Pro-Asp-Tyr

(6) Val-Ile-Pro-Pro-Gly-Val-Pro-Tyr

(7) Glu-Gln-Gln-Gly-Lys-Gly-Ile

(8) Ser-Gly-Phe-Ala-Pro

(式中、アミノ酸残基を表わす各記号は、アミノ酸化学において慣用の表示法によるものである。)

【0002】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】摂取された食品は消化管の中で分解、吸収される過程で宿主免疫系へ種々の影響を与えることが知られている(J. L. Decker et al. : Ann. Intern. Med., 101, 810-824 (1984))。宿主の免疫反応は免疫担当細胞であるリンパ球

及びマクロファージから分泌される生理活性物質によって調節、制御されていることが知られているが、一方、食品成分中にも宿主免疫系を調節する物質の存在が知られている。その中には、食品蛋白質を酵素的に分解したペプチドとして、ヒトカゼイン由来Gly-Leu-Phe、ウシカゼイン由来Leu-Leu-Tyr、ヒトβカゼイン由来Val-Glu-Pro-Ile-Pro-Tyrのものが知られておりいずれもマクロファージの活性を上昇させることが見いだされている。(F. Parker et al.: Eur. J. Biochem. 145, 677-682 (1984), J. Berthou et al.: FABS Lett., 218, 55-58 (1987))。生体内に摂取された食品蛋白質は、そのままの形かあるいは分解されてペプチドの形で免疫応答系細胞と接する。このような食品成分と免疫応答系細胞との相互作用は、これまで知られているところでは、たとえば免疫系の異常状態である食品アレルギーを引き起こす場合があり、さらに、免疫系の賦活あるいは抑制という形となって観察されている。免疫応答系を調節する本来の生体内物質としてインターロイキンをはじめとするサイトカインと呼ばれる一群のポリペプチドであり、その機能及び構造について多くの情報が集積しつつある。これに対し、食品たん白質由来のペプチドで免疫調節機能をもつものは多くはなく、未だ医薬品としての開発が進んでいるとの報告はない。

【0003】

【課題を解決するための手段】本発明者は、大豆のタンパク質分解酵素の分解液から薬理作用を有する物質を検索し、新規な8種のペプチドが強い免疫賦活作用を有することを見出した。そして、これら8種のペプチドを医薬品として実用化するための研究を鋭意行った。その結果、この8種のペプチドが免疫賦活作用を有し、天然物由来の免疫賦活剤としての有用性を見出した。本発明に係る知見に基づくものである。以下に、本発明を詳細に説明する。本発明に係る新規なペプチドは、次式

(1)、(2)、(3)、(4)、(5)、(6)、(7)及び(8)

(1) Phe-Thr-Lys-Pro-Gly

(2) Leu-Lys-Pro-Asn

(3) Phe-Gly-Pro-Gly

(4) Glu-Asp-Lys-Pro-Phe-Asn-Leu

(5) Ala-Glu-Ile-Asn-Met-Pro-Asp-Tyr

(6) Val-Ile-Pro-Pro-Gly-Val-Pro-Tyr

(7) Glu-Gln-Gln-Gly-Lys-Gly-Ile

(8) Ser-Gly-Phe-Ala-Pro

(式中の各記号はペプチド化学におけるアミノ酸配列の

各アミノ酸単位を示す。)の式で示されるL体のアミノ酸の配列を有する新規なペプチドであり、常温における性状は白色の粉末である。

【0004】前記の8種のペプチドは、化学的に合成する方法または大豆のタンパク質分解酵素の分解液から分離精製する方法を挙げることができる。本発明に係る新規なペプチドを化学的に合成する場合には、液相法または固相等の通常のペプチド合成方法によって行うことができるが、好ましくは、固相法によってポリマー性の固相支持体へ前記ペプチドのC末端(カルボキシル末端側)からそのアミノ酸残基に対応したL体のアミノ酸を順次ペプチド結合によって結合して行くのがよい。そして、そのようにして得られた合成ペプチドは、トリフルオロメタンスルホン酸、フッ化水素等を用いてポリマー性の固相支持体から切断した後、アミノ酸側鎖の保護基を除去し、逆相系のカラムを用いた高速液体クロマトグラフィー(以下、HPLCと略記する。)等を用いた通常の方法で精製することができる。

【0005】上記したように、本発明に係る新規なペプチドは大豆のタンパク質分解酵素の分解液から分離精製することができるが、その場合には、発明者等の文献[J. Nutr. Biochem., 1993, Vol. 4, August]の方法に準拠し、例えば、以下のようにして行うことができる。上記の新規なペプチドを含有している生大豆を用いて、適当な溶媒(例えば、水-トリス塩酸緩衝液、リン酸緩衝液の中性の緩衝液等)中で十分にホモジネイトした後、加水分解する。加水分解は常法に従って行う。例えば、ペプシン等のタンパク質分解酵素で加水分解する場合は、生大豆ホモジネイトを必要とあれば更に加水分解した後、酵素の至適温度まで加温しpHを至適値に調整し、酵素を加えてインキュベートする。次いで必要に応じて中和した後、酵素を失活させて加水分解液を得る。その加水分解液を濾紙および/またはセライト等を用いて濾過することによって不溶性成分を除去し、得られた濾液をセロファン等の半透膜を用いて適当な溶媒(例えば、トリス塩酸緩衝液、リン酸緩衝液の中性の緩衝液等)中で十分に透析し、その濾液中の成分で半透膜を通過した成分を含む溶液を強酸性陽イオン交換樹脂(例えば、ダウケミカル社製のDowex 50W等)にかけ、その吸着溶出分画から免疫賦活作用を有する成分を含有する分画を得、得られた免疫賦活作用を有する分画をゲル濾過(例えば、ファルマシア社製のSephadex G-25等)によって分画し、得られた免疫賦活作用を有する分画を陽イオン交換ゲル濾過(例えば、ファルマシア社製のSP-Sephadex C-25等)によって分画し、得られた免疫賦活作用を有する分画を更に逆相HPLCによって分画する。

【0006】この新規な8種のペプチドは、静脈内への繰返し投与を行った場合、抗体産生を惹起せず、アナフ

5

イラキシショックを起こさない。また、このペプチドは、アミノ酸のみの配列構造からなり、投与後、生体内のプロテアーゼにより徐々に分解される為、毒性は極めて低く安全性は極めて高い ($LD_{50} > 5000 \text{ mg/Kg}$: ラット経口投与)。本発明に係る新規なペプチドは、通常用いられる賦形剤等の添加物を用いて注射剤、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤等に調整することができる。投与方法としては、通常は免疫不全症を有している哺乳類 (例えば、ヒト、イヌ、ラット等) に注射すること、あるいは経口投与することがあげられる。投与量は、例えば、動物体重 1 kg 当たりこのペプチドを $0.01 \sim 10 \text{ mg}$ の量である。投与回数は、通常、1日1～4回程度であるが、投与経路によって、適宜、調整することができる。上記の各種製剤において用いられる賦形剤、結合剤、滑沢剤の種類は、特に限定されず、通常の注射剤、散剤、顆粒剤、錠剤あるいはカプセル剤に用いられるものを使用することができる。

【0007】錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤に用いる添加剤としては、下記のをあげることができる。賦形剤としては、結晶セルロース等の糖類、マンニトール等の糖アルコール類、でんぷん類、無水リン酸カルシウム等；結合剤としてはでんぷん類、ヒドロキシプロピルメチルセルロース等；崩壊剤としてはカルボキシメチルセルロースおよびそのカルウム塩類；滑沢剤としてはステアリン酸およびその塩類、タルク、ワックス類を挙げることができる。また、製剤の調整にあたっては、必要に応じてメントール、クエン酸およびその塩類、香料等の矯臭剤を用いることができる。注射用の無菌組成物は、常法により、本発明に係る新規なペプチドを、注射用水、生理食塩液およびキシリトールやマンニトールなどの糖アルコール注射液、プロピレングリコールやポリエチレングリコール等のグリコールに溶解または懸濁させて注射剤とすることができる。この際、緩衝液、防腐剤、酸化防止剤等を必要に応じて添加することができる。本発明の新規なペプチドを含有する製剤は凍結乾燥品または乾燥粉末の形とし、用時、通常の溶解剤、例えば水または生理食塩液にて溶解して用いることもできる。

【0008】本発明に係る新規なペプチドは、優れた免疫賦活作用を有し、新規なペプチドをウサギに経口投与すると、末梢血リンパ球のコンカナバリンA (以下ConAと略記する。) 刺激に対する幼若化反応が有意に上昇し、又、新規なペプチドをC57BL/6マウスに経口投与すると抗体産生能が上昇した。更に、新規なペプチドは、*in vitro*においてC3H/HeNマウスより得た脾細胞に対してマイトージェン活性を示す。

【0009】

【実施例】以下に実施例として、製造例及び試験例を記載し、本発明を更に詳細に説明する。

製造例1

6

生大豆 200 g に脱イオン水 1 l を加えホモジナイズした後、 1 N 塩酸にて pH を 2.0 に調整し、ペプシン (メルク社製、酵素番号 EC 3.4.23.1) 10 g を添加し、 37°C で2時間攪拌しながら加水分解を行った。分解反応液を直ちに限外濾過膜 (アミコン社製、YM10型、 $\phi 76 \text{ mm}$) に通過させ、通過液を強酸性陽イオン交換樹脂Dowex 50W X4

[H^+] ($\phi 4.5 \times 15 \text{ cm}$) カラムに加えた。カラムを脱イオン水で十分に洗浄した後、 2 N 水酸化アンモニウム液 2 l を用いて溶出した。減圧濃縮によりアンモニアを除去し、濃縮液 40 ml を得た。濃縮液 4 ml を予め脱イオン水で緩衝化したSephadex G-25 カラム ($\phi 2.5 \times 150 \text{ cm}$) に負荷し、流速 30 ml/hr 、各分画量 8.3 ml でゲル濾過した。その結果は図1に示すとおりである。上記のゲル濾過を繰り返して大量分取した免疫賦活活性の高い分画 (分画番号17～37) を集め、凍結乾燥してペプチド粉末 (大豆由来のペプチド粉末) とした。このペプチド粉末を脱イオン水に溶解した後、予め、脱イオン水で緩衝化したSP-Sephadex C-25 [H^+] ($\phi 1.5 \times 47.2 \text{ cm}$) カラムに負荷し、脱イオン水 1 l から3%塩化ナトリウム液 1 l の濃度勾配法により、流速 60 ml/hr 、各分画量 7.8 ml でクロマトグラフィーを行った。その結果は図2に示すとおりである。

【0010】上記クロマトグラフ中、分画番号30～38の免疫賦活活性の高い分画を集めて凍結乾燥して精製ペプチド粉末 (SP-I分画部分)、分画番号39～47の免疫賦活活性の高い分画を集めて凍結乾燥して精製ペプチド粉末 (SP-II分画部分) を得た。これら精製ペプチド粉末 (SP-I、SP-II分画部分) を脱イオン水に溶解した後HPLCを行った。条件はカラムとして野村化学 (株) 製Develosil ODS-50 ($\phi 4.6 \text{ mm}$ ID $\times 25 \text{ cm}$) を使用し、移動相として0.05%トリフルオロ酢酸 (以下、TFAと略記する。) から25%アセトニトリル/0.05% TFAの濃度勾配法により、流速 1.0 ml/min 、検出波長 220 nm でクロマトグラフィーを行い、免疫賦活活性を有するペプチドを得た。その結果は図3に示すとおりである。

{溶出時間; (1) のペプチド32分、(2) のペプチド38分、(3) のペプチド83分、(4) のペプチド122分、(5) のペプチド127分、(6) のペプチド142分、(7) のペプチド41分、(8) のペプチド109分}

このようにして得られた免疫賦活作用を有するペプチドのアミノ酸配列は、アブライドバイオシステム社製のプロテインシーケンサー477A型を用いて決定された。その結果、8種のペプチドは、それぞれ、

次式、(1) Phe-Thr-Lys-Pro-Gly
(2) Leu-Lys-Pro-Asn

(3) Phe-Gly-Pro-Gly

(4) Glu-Asp-Lys-Pro-Phe-Asn-Leu

(5) Ala-Glu-Ile-Asn-Met-Pro-Asp-Tyr

(6) Val-Ile-Pro-Pro-Gly-Val-Pro-Tyr

(7) Glu-Gln-Gln-Gly-Lys-Gly-Ile

(8) Ser-Gly-Phe-Ala-Pro

で示されるL体のアミノ酸残基からなる配列を有するペプチドであることが確認された。

【0011】製造例2

本例は、合成法による製造例である。

Phe-Thr-Lys-Pro-Glyの合成法。

アブライドバイオシステム社製のペプチド自動合成装置430A型を用いた固相法によって当該ペプチドを合成した。固相担体としては、スチレンジビニルベンゼン共重合体（ポリスチレン樹脂）をクロロメチル化した樹脂を使用した。まず、当該ペプチドのアミノ酸配列に従って、常法どおり、そのC末端側のグリシンからクロロメチル樹脂に反応させペプチド結合樹脂を得た。このときのアミノ酸は、*t*-ブトキシカルボニル（以下*t*-Bocと略記す。）基で保護された*t*-Bocアミノ酸を使用した。次にこのペプチド結合樹脂をエタンジチオールとチオアニソールからなる混合液に懸濁し、室温で10分間攪拌後、氷冷下でトリフルオロ酢酸を加え、更に10分間攪拌した。この混合液にトリフルオロメタンスルホン酸を滴下し、室温で30分間攪拌した後、無水エーテルを加えてその生成物を沈澱させて分離し、その沈澱物を無水エーテルで数回洗浄した後、減圧下で乾燥した。このようにして得られた末精製の合成ペプチドは蒸留水に溶解した後、逆相系のカラムC₁₈（5μm）を用いたHPLCにより精製した。移動相として（A）0.1%TFA含有蒸留水、（B）0.1%TPA含有アセトニトリル溶液を使用し、（A）液が20分間で98%→78%の濃度勾配法により流速1.5ml/minでクロマトグラフィーを行った。紫外部波長215nmで検出し、最大の吸収を示した溶出分画を分取し、これを凍結乾燥することによって目的とする合成ペプチドを得た。

【0012】この合成ペプチドをマスマスペクトルにより分析した結果、アミノ酸配列構造を有するペプチドであることが確認された。このマスマスペクトルの結果は図4に示すとおりである。他の7つのペプチドについても上記合成方法に準じ固相法によりそれぞれC末端側から反応させ合成した。末精製の合成ペプチドは以下に示すとおり精製した。

Leu-Lys-Pro-Asnの精製法

逆相系のカラムC₁₈（5μm）を用いたHPLCによ

り精製した。移動相として（A）0.1%TFA含有蒸留水、（B）0.1%TFA含有アセトニトリル溶液を使用し、（A）液が20分間で90%→60%の濃度勾配法により流速1.5ml/minでクロマトグラフィーを行った。紫外部波長215nmで検出し、最大の吸収を示した溶出分画を分取し、これを凍結乾燥することによって目的とする合成ペプチドを得た。

【0013】この合成ペプチドをマスマスペクトルにより分析した結果、アミノ酸配列およびアミノ酸組成が前記式で示したアミノ酸配列構造を有するペプチドであることが確認された。このマスマスペクトルの結果は図5に示すとおりである。

Phe-Gly-Pro-Glyの精製法

逆相系のカラムC₁₈（5μm）を用いたHPLCにより精製した。移動相として（A）0.1%TFA含有蒸留水、（B）0.1%TFA含有アセトニトリル溶液を使用し、（A）液が20分間で98%→78%の濃度勾配法により流速1.5ml/minでクロマトグラフィーを行った。紫外部波長215nmで検出し、最大の吸収を示した溶出分画を分取し、これを凍結乾燥することによって目的とする合成ペプチドを得た。

【0014】この合成ペプチドをマスマスペクトルにより分析した結果、アミノ酸配列およびアミノ酸組成が前記式で示したアミノ酸配列構造を有するペプチドであることが確認された。このマスマスペクトルの結果は図6に示すとおりである。

Glu-Asp-Lys-Pro-Phe-Asn-Leuの精製法

逆相系のカラムC₁₈（5μm）を用いたHPLCにより精製した。移動相として（A）0.1%TFA含有蒸留水、（B）0.1%TFA含有アセトニトリル溶液を使用し、（A）液が20分間で98%→78%の濃度勾配法により流速1.5ml/minでクロマトグラフィーを行った。紫外部波長215nmで検出し、最大の吸収を示した溶出分画を分取し、これを凍結乾燥することによって目的とする合成ペプチドを得た。

【0015】この合成ペプチドをマスマスペクトルにより分析した結果、アミノ酸配列およびアミノ酸組成が前記式で示したアミノ酸配列構造を有するペプチドであることが確認された。このマスマスペクトルの結果は図7に示すとおりである。

Ala-Glu-Ile-Asn-Met-Pro-Asp-Tyrの精製法

逆相系のカラムC₁₈（5μm）を用いたHPLCにより精製した。移動相として（A）0.1%TFA含有蒸留水、（B）0.1%TFA含有アセトニトリル溶液を使用し、（A）液が20分間で98%→78%の濃度勾配法により流速1.5ml/minでクロマトグラフィーを行った。紫外部波長215nmで検出し、最大の吸収を示した溶出分画を分取し、これを凍結乾燥すること

によって目的とする合成ペプチドを得た。

【0016】この合成ペプチドをマススペクトルにより分析した結果、アミノ酸配列およびアミノ酸組成が前記式で示したアミノ酸配列構造を有するペプチドであることが確認された。このマススペクトルの結果は図8に示すとおりである。

Val-Ile-Pro-Pro-Gly-Val-Pro-Tyrの精製法

逆相系のカラムC₁₈ (5μm)を用いたHPLCにより精製した。移動相として(A)0.1%TFA含有蒸留水、(B)0.1%TFA含有アセトニトリル溶液を使用し、(A)液が20分間で98%→78%の濃度勾配法により流速1.5ml/minでクロマトグラフィーを行った。紫外波長215nmで検出し、最大の吸収を示した溶出分画を分取し、これを凍結乾燥することによって目的とする合成ペプチドを得た。

【0017】この合成ペプチドをマススペクトルにより分析した結果、アミノ酸配列およびアミノ酸組成が前記式で示したアミノ酸配列構造を有するペプチドであることが確認された。このマススペクトルの結果は図9に示すとおりである。

Glu-Gln-Gln-Gly-Lys-Gly-Ileの精製法

逆相系のカラムC₁₈ (5μm)を用いたHPLCにより精製した。移動相として(A)0.1%TFA含有蒸留水、(B)0.1%TFA含有アセトニトリル溶液を使用し、(A)液が20分間で98%→78%の濃度勾配法により流速1.5ml/minでクロマトグラフィーを行った。紫外波長215nmで検出し、最大の吸収を示した溶出分画を分取し、これを凍結乾燥することによって目的とする合成ペプチドを得た。

【0018】この合成ペプチドをマススペクトルにより分析した結果、アミノ酸配列およびアミノ酸組成が前記式で示したアミノ酸配列構造を有するペプチドであることが確認された。このマススペクトルの結果は図10に示すとおりである。

Ser-Gly-Phe-Ala-Proの精製法

逆相系のカラムC₁₈ (5μm)を用いたHPLCにより精製した。移動相として(A)0.1%TFA含有蒸留水、(B)0.1%TFA含有アセトニトリル溶液を使用し、(A)液が20分間で98%→78%の濃度勾配法により流速1.5ml/minでクロマトグラフィーを行った。紫外波長215nmで検出し、最大の吸収を示した溶出分画を分取し、これを凍結乾燥することによって目的とする合成ペプチドを得た。

【0019】この合成ペプチドをマススペクトルにより分析した結果、アミノ酸配列およびアミノ酸組成が前記式で示したアミノ酸配列構造を有するペプチドであることが確認された。このマススペクトルの結果は図11に示すとおりである。合成によって得られた本発明の8種

のペプチドは、以下に示す試験によって薬理効果が確認された。

【0020】試験例1

(ウサギ末梢血リンパ球のコンカナバリンA刺激に対する幼若化反応の測定) ウサギは成熟雄性日本白色種(KBL: JW、SPF、体重2.0kg)を(株)北山ラベスより購入し、1週間予備飼育を行った後、健康な動物を試験に供した。飼育は温度23±2℃、湿度55±10%に保った飼育室内の金属製個別ゲージで行った。飼料はオリエンタル酵母(株)製RC4を1日120g給餌し、水は自家揚水(水道法、水質基準適合)を自由に摂取させた。1群3例のウサギを用い、製造例1における大豆由来のペプチド粉末200mg/kg/dayを体重1kg当り5mlの割合で30日間連続投与した。対照群には同容量の溶媒を投与した。体重測定は3日毎に行った。投与開始日並びに最終投与の翌日、各ウサギの耳静脈からヘパリン処理した注射器で10mlの血液を採取し、3時間以内に、リンパ球分離並びに³H-サイミジン取り込み能測定法による幼若化反応を実施した。各リンパ球の取り込んだ放射能から次式により刺激指数(SI)を算出した。

$SI = (\text{ConAを加えた培養系}) / (\text{ConAを加えない培養系})$

大豆由来のペプチド粉末(200mg/kg/day)を30日間経口投与したウサギの体重変化は表1に示した。体重変化は大豆ペプチド投与群と対照群との間に有意差は認められなかった。又、ウサギ末梢血リンパ球のConA刺激による幼若化反応(SI値)を表2に示した。この結果、大豆ペプチドの投与前5.3±0.6から投与後44.8±7.0に上昇し、有意差(p<0.01、t検定)が認められた。

【0021】試験例2

(マウス脾細胞の抗体産生能測定) マウスは雄性、5週齢(S1c: C57BL/6、SPF)を日本エスエルシー(株)より購入し、1週間予備飼育を行った後、健康な動物を試験に供した。マウスの飼育は温度23±2℃、湿度55±10%に保った飼育室内のエアコンゲージで行った。餌料はオリエンタル酵母(株)製MF、水は自家揚水(水道法、水質基準適合)を自由に摂取させた。1群3例のマウスを用い、製造例1における大豆由来のペプチド粉末200mg/kg/dayを体重10g当り0.1mlの割合で10日間連続経口投与した。体重は、毎日計測した。大豆ペプチドの投与開始から5日後、それぞれのマウスの尾静脈にヒツジ赤血球(SRBC、デンカ生研(株))5X10⁸ cells/mlを0.2ml投与して免疫した。免疫の5日後、各群のマウスから脾臓を採取し、Eagle's minimal essential medium(EMEM、日水製薬(株))を入れたシャーレ内で脾細胞を遊離させた。リン酸緩衝液(PBS)で3回洗浄した後、EM

11

EMで 2.5×10^6 cells/mlに調整した脾細胞と50%SRBC浮遊液及びモルモット乾燥補体(デンカ生研(株))を8:1:1の割合で混合した。Cunningham, A. J. らの方法(Immunology, 14, 599, (1968))に準じて37℃で90分反応後、溶血斑(plaque forming cell, PFC)を計測した。大豆由来のペプチド粉末(200mg/kg/day)を10日間経口投与したマウスの体重変化並びに脾細胞調製時に測定した脾臓重量を表3に示した。体重変化において大豆ペプチド投与群と対照群との間に有意差は認められなかった。又、大豆ペプチド投与群の脾臓重量は 104.7 ± 6.1 、対照群のそれは 73.1 ± 10.9 で両者間に有意差は認められなかった。マウス脾細胞での抗体産生能を表4に示した。大豆ペプチド投与群の抗体産生細胞数は 1112 ± 306.6 であり、対照群の抗体産生細胞数 493.3 ± 170.2 と比較して有意($p < 0.01$, t検定)に上昇していた。

【0022】試験例3

(合成ペプチドのマイトーゲン活性の測定) 藤原らの方法(栄養誌, Vol. 43, No. 3, 203-208, (1990))に準じてマイトーゲン活性を測定した。製造例2で合成した新規な8種類のペプチドは、25mM HEPES-RPMI 1640培地に対して溶解(最大濃度1mg/ml)し、0.2μmのフィルター通過滅菌後、同培地により2倍ごと段階希釈を行ったものを供試サンプルとした。C3H/HeNマウス(6週齢、雄性)の脾臓を無菌的に摘出し、ワイヤーメッシュ上で25mM HEPES-RPMI 1640培地を滴下しながら穏やかに磨砕し、通過液を更にもう一組のワイヤーメッシュを通すことにより単細胞浮遊液を調製した。脾細胞は同培地にて3回洗浄後、牛胎児血清10%を含む25mM HEPES-RPMI 1640培地に浮遊させ、96ウェルマイクロプレートに 5×10^5 個/100μl/ウェルとなるように分注した。その後、前記の供試サンプル10μlを加え、5%CO₂雰囲気下、37℃で培養した。尚、陰性対照には、25mM MHEPS-RPMI 1640培地10μlを、陽性対照にはコンカナバリンA(ConA、終濃度1μg/ml)並びにリボポリサッカライド(LPS、終濃度100μg/ml)を供試サンプルの代わりに加えている。その後、0.5%の3-(4,5-ジメチル-2-チアゾリル)-2,5ジフェニル-2Hテトラゾリウムプロマイド(MTT)溶液を10μl加え、更に3時間培養を行い、しかる後、生じたMTT-フォルマザンを酸-イソプロパノール溶液(0.04N濃度に塩酸を添加)100μlを加えて溶解し、EIAリーダーにて595nmの吸光度を測定した。データは陰性対照の値を100とした相対値にて表示している。マイトーゲン活性の結果は表5に示すとおりである。以上の試験の結

12

果、本発明に係わる新規な8種のペプチドより成る大豆由来のペプチド粉末は、in vivoにおいて有意に免疫機能に影響を及ぼすことが確認された。更に、本発明に係わる新規な8種の合成ペプチドは、in vitroにおいて有意にマイトーゲン活性を示すことが確認され、免疫賦活剤として有用である。尚、本発明に係わる新規な8種のペプチドは、構造的にそのアミノ酸配列を部分構造とするペプチドにおいて、構造中に採用することもできる。

【0023】

【表1】

Table 1

群	動物 番号	投与後の体重 (kg)										日数		
		1	4	7	10	13	16	19	22	25	28	31		
対照	5	1.88	1.80	1.78	2.00	1.97	1.98	1.99	2.06	2.16	2.20	2.24		
	7	1.88	1.95	1.88	2.04	2.00	2.17	2.27	2.23	2.21	2.32	2.52		
	8	2.14	2.25	2.20	2.28	2.32	2.35	2.48	2.50	2.59	2.61	2.70		
	Mean ± SD	1.96 0.16	2.00 0.23	1.95 0.22	2.11 0.15	2.10 0.19	2.17 0.19	2.25 0.25	2.26 0.22	2.32 0.24	2.38 0.21	2.49 0.23		
大豆 ペプチド (200mg/kg)	2	1.97	1.95	1.91	2.03	2.08	2.10	2.15	2.25	2.22	2.28	2.30		
	6	1.83	1.91	1.83	1.99	2.03	2.18	2.23	2.29	2.32	2.33	2.45		
	9	1.95	2.02	2.00	2.02	2.10	2.08	2.13	2.20	2.29	2.35	2.42		
	Mean ± SD	1.92 0.08	1.96 0.06	1.95 0.05	2.01 0.02	2.07 0.04	2.12 0.05	2.17 0.05	2.25 0.05	2.28 0.05	2.32 0.04	2.39 0.08		

Mean ± SD; 平均値 ± 標準偏差

本発明に係る新規な8種のペプチドの、製造例1における大豆由来のペプチド粉末投与時のウサギ体重変化。

【0024】

【表2】

群	動物 番号	コンカナバリンA刺激 (cpm)					
		投与前			投与後		
		Con A ¹	Control ²	S I ³	Con A ¹	Control ²	S I
対 照	5	7,818	930	8	1,276	388	3.2
	7	8,918	1,108	8	1,585	272	5.8
	8	9,788	1,262	7	3,759	586	6
	Mean ± SD	8,834.7 977.7	1,089.3 168.1	7.7 0.6	2,208.7 1,353.2	415.3 158.8	5 1.6
大 豆 ペプチド (200mg/kg)	2	5,253	1,063	4.9	45,113	923	48.9
	6	4,953	829	6.0	37,258	763	48.8
	9	6,456	1,313	4.9	40,125	1,093	36.7
	Mean ± SD	5,554 797.4	1,068.3 242.0	5.3 0.6	40,831.3 3,975.8	926.3 165.0	44.8 7.0

1) ConAを加えた培養系のカウント (cpm)

2) ConAを加えない培養系のカウント (cpm)

3) 刺激指数 (S I) = (1)/(2)

本発明に係る新規な8種のペプチドの、製造例1における大豆由来のペプチド粉末投与時の、ウサギ末梢血リンパ球のコンカナバリンA刺激による幼若化反応。

【0025】

【表3】

Table 3

15

群	動物 番号	投与後の体重 (g)										脾 重 量 (mg)	
		日 数											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		11
対 照	2	21.4	19.8	20.0	20.3	20.1	19.3	19.6	20.0	20.1	20.1	19.8	82.4
	5	19.3	19.2	19.7	19.8	19.6	19.7	19.9	20.2	19.6	19.9	19.7	61.6
	8	20.9	20.9	21.4	22.2	21.9	22.6	22.0	22.0	22.1	21.9	21.8	75.8
	Mean	20.5	19.9	20.4	20.8	20.5	20.5	20.5	20.7	20.6	20.6	20.4	73.1
	±SD	1.1	0.9	0.9	1.3	1.2	1.8	1.3	1.2	1.3	1.1	1.2	10.9
大豆 ペプチド (200mg/kg)	4	20.8	20.2	20.4	20.9	19.2	19.0	22.0	20.5	20.9	22.5	21.3	106.0
	7	19.2	20.9	19.6	19.6	20.9	19.5	19.8	19.7	21.0	19.3	22.1	110.0
	9	21.8	19.1	21.7	22.1	21.3	22.1	20.1	20.9	19.5	20.5	19.2	98.0
	Mean	20.5	20.1	20.6	20.9	20.5	20.2	20.6	20.4	20.5	20.8	20.9	104.7
	±SD	1.3	0.9	1.1	1.3	1.1	1.7	1.2	0.6	0.8	1.8	1.5	6.1

(9)

特開平8-225594

16

本発明に係る新規な8種のペプチドの、製造例1における大豆由来のペプチド粉末投与時の、マウス体重変化と脾臓重量。

【0026】

【表4】

10

20

30

17

18

群	動物番号	抗体産生細胞数 ¹
対 照	2 5 8	685 435 380
	Mean ± SD	493.3 170.2
大 豆 ペプチド (200mg/kg)	4 7 9	982 893 1,463
	Mean ± SD	1,112.7 306.6

1) 抗体産生細胞数; PFC (溶血斑) / 10⁶ 脾細胞

本発明に係る新規な8種のペプチドの、製造例1における大豆由来のペプチド粉末投与時の、マウス脾細胞での抗体産生能。 * 【0027】
【表5】

Table 5

ペプチド	最終濃度 (μg/ml)							陽性対照	
	100	50	25	2.5	0.25	3.13	0.67	ConA	LPS
(1) Phe-Thr-Lys-Pro-Gly	110	127	107	102	104	102	102	263	173
(2) Leu-Lys-Pro-Asn	121	142	113	108	101	89	88	270	142
(3) Phe-Gly-Pro-Gly	119	133	110	102	103	105	94	268	162
(4) Glu-Asp-Lys-Pro-Phe-Asn-Leu	106	129	101	102	100	94	90	228	148
(5) Ala-Glu-Ile-Asn-Net-Pro-Asp-Tyr	107	156	126	113	109	108	105	238	154
(6) Val-Ile-Pro-Pro-Gly-Val-Pro-Tyr	110	130	105	101	104	107	93	256	180
(7) Glu-Gln-Gln-Gly-Lys-Gly-Ile	112	161	142	127	111	102	101	273	184
(8) Ser-Gly-Phe-Ala-Pro	121	157	132	109	105	103	98	266	179

データは陰性対照の値を100とした相対値で表示

本発明に係る新規な8種の合成ペプチドの、in vi 40※【図3】本発明に係る新規な8種のペプチドの、製造例1における逆相高速液体クロマトグラフィーによる免疫賦活ペプチドの分離精製の結果を示す図である。上図のHPLCパターンは、製造例1における精製ペプチド粉末 (SP-I 分画部分) を供試料とし、下図のHPLCパターンは、精製ペプチド粉末 (SP-II 分画部分) を供試料としたものである。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明に係る新規な8種のペプチドの、製造例1におけるSephadex G-25カラムクロマトグラフィーによる免疫賦活ペプチドの分離精製の結果を示す図である。

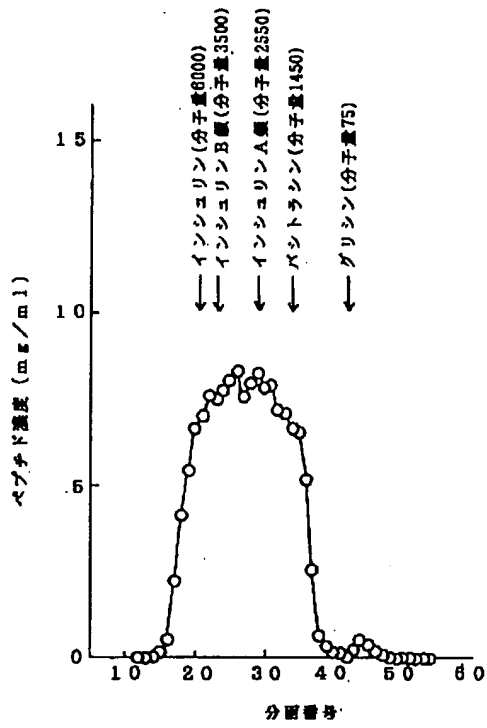
【図2】本発明に係る新規な8種のペプチドの、製造例1におけるSP-Sephadex C-25

[H+] カラムクロマトグラフィーによる免疫賦活ペプチドの分離精製の結果を示す図である

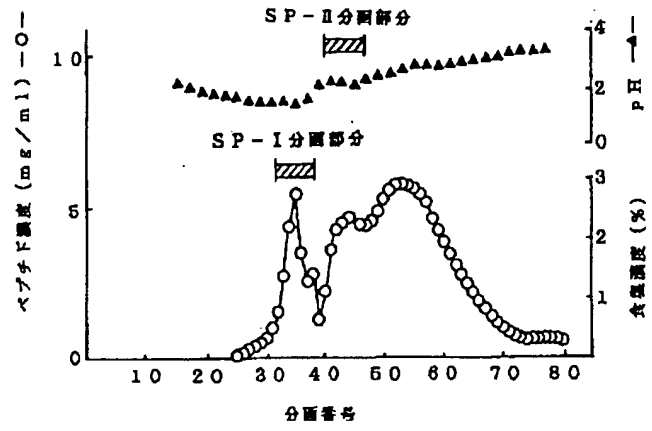
※50

【図4、図5、図6、図7、図8、図9、図10、図11】同、製造例2で得られた8種の合成ペプチドのマススペクトルを示す図である。

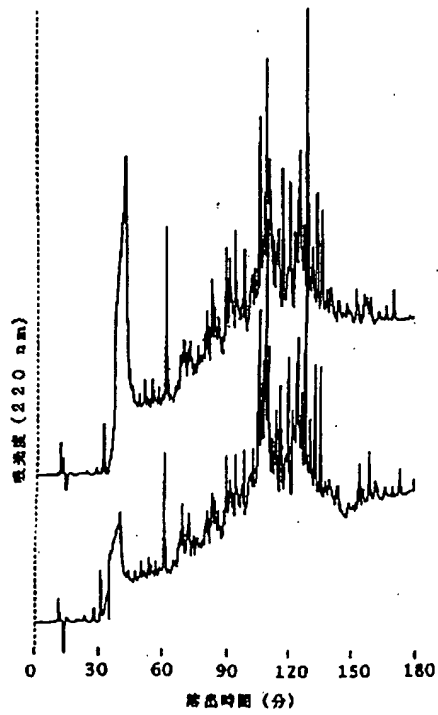
【図1】



【図2】

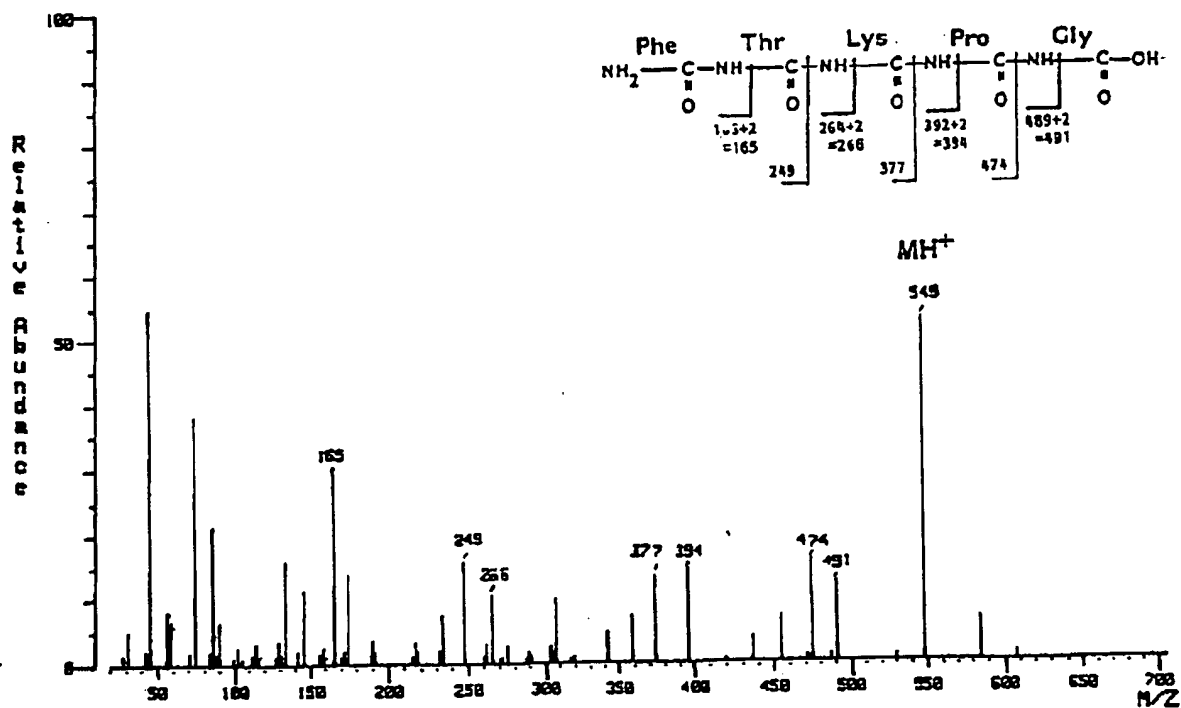


【図3】



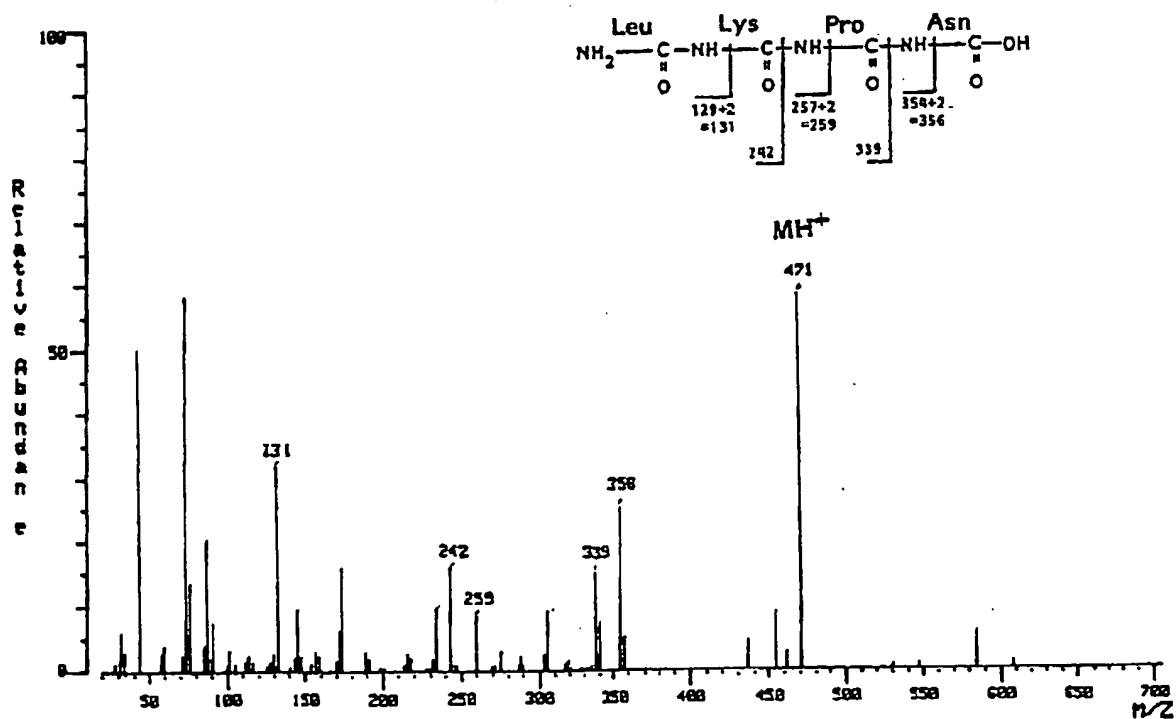
【図4】

Phe-Thr-Lys-Pro-Glyのマスマスペクトル



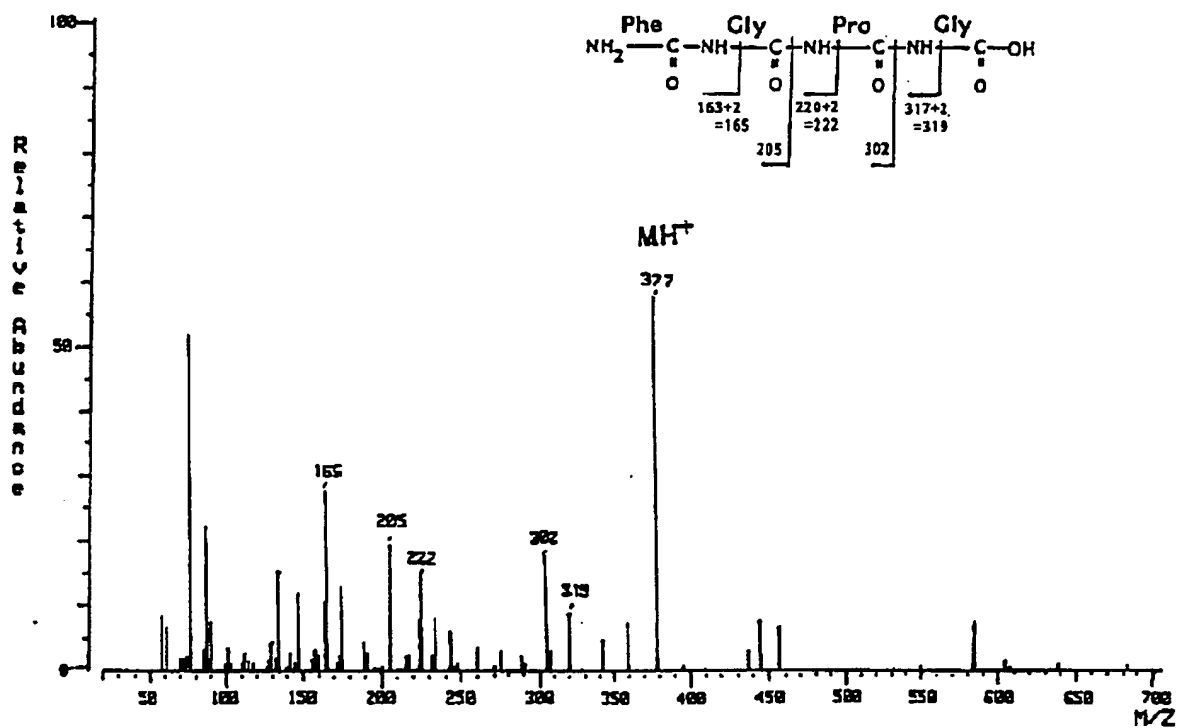
【図5】

Leu-Lys-Pro-Asnのマスマスペクトル



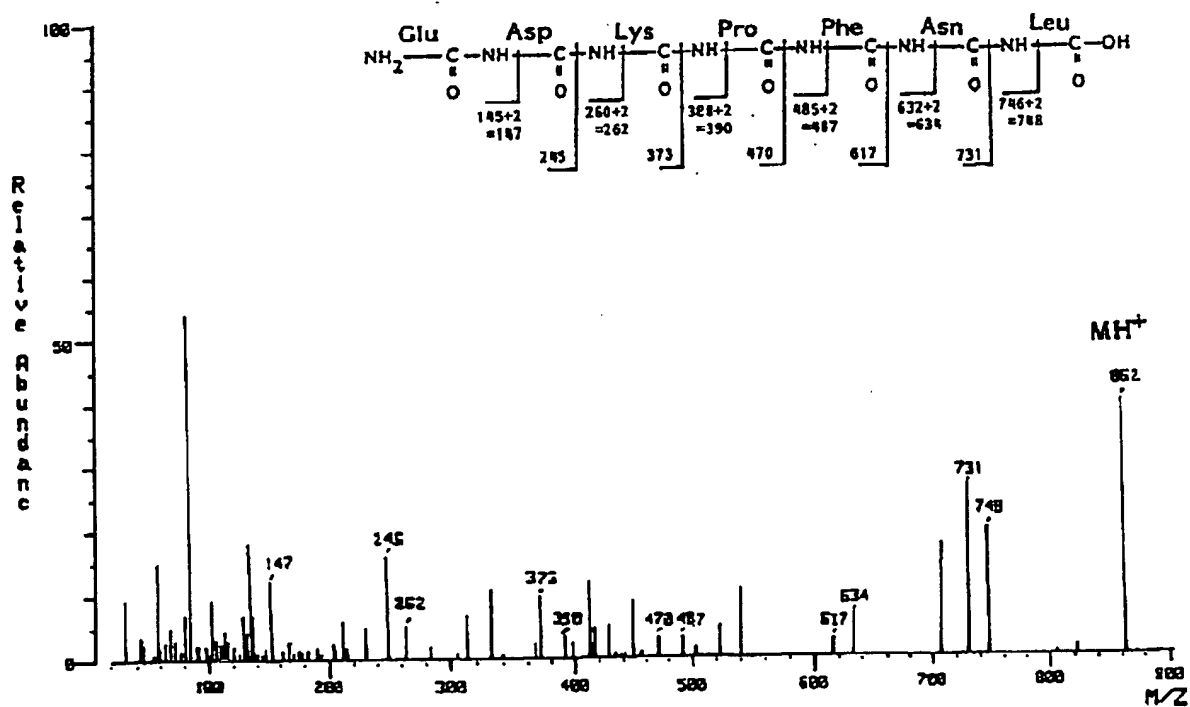
【図6】

Phe-Gly-Pro-Glyのマスペクトル



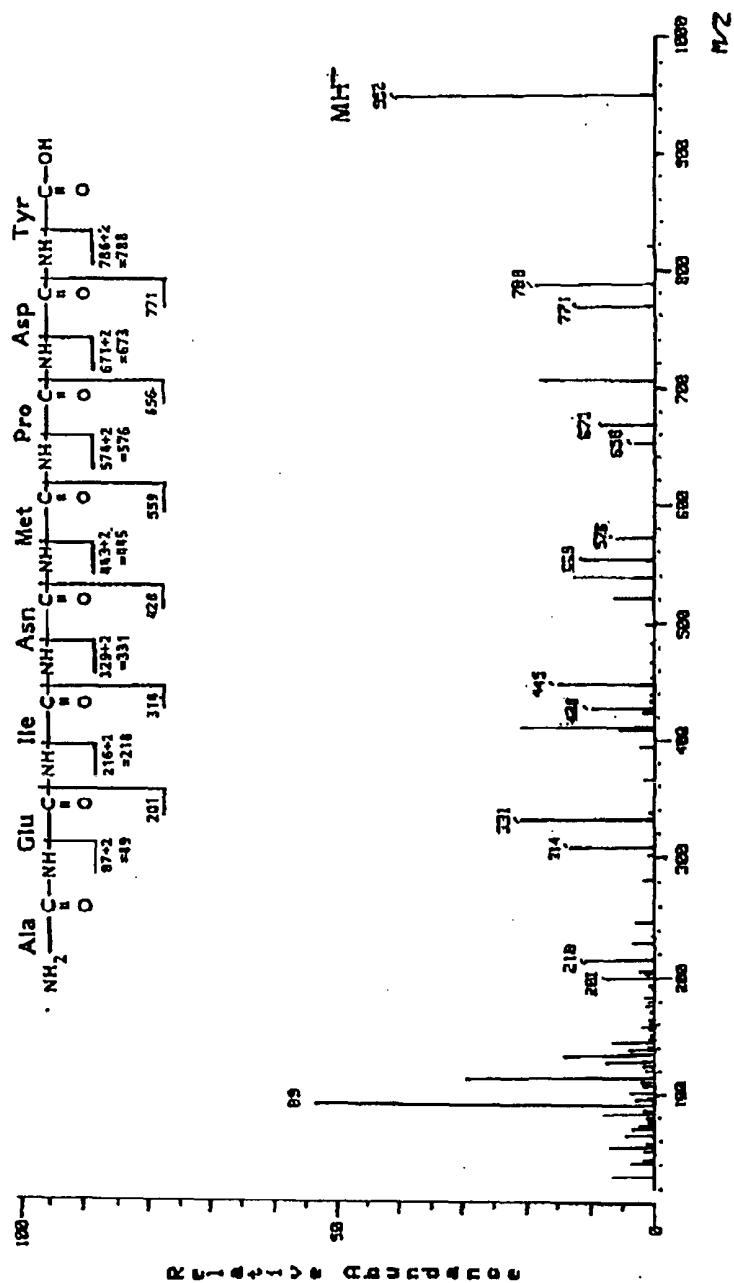
【図7】

Glu-Asp-Lys-Pro-Phe-Asn-Leuのマスペクトル



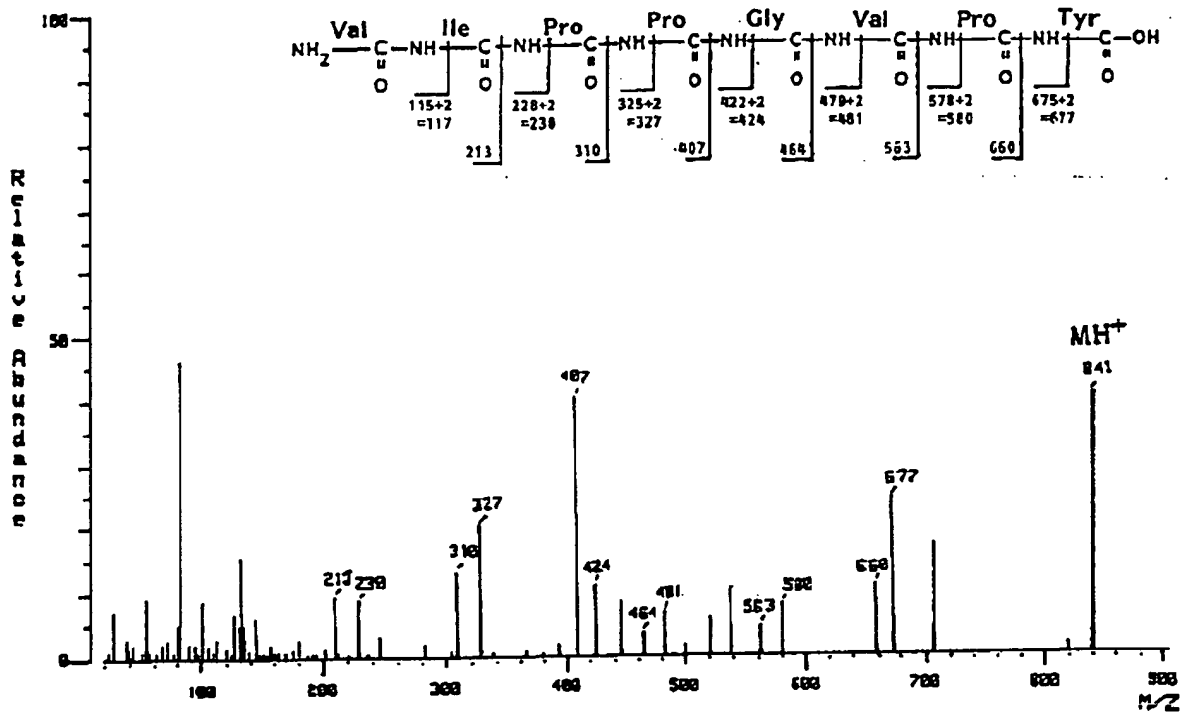
【図8】

Ala-Glu-Ile-Asn-Met-Pro-Asp-Tyrのマスマスペクトル



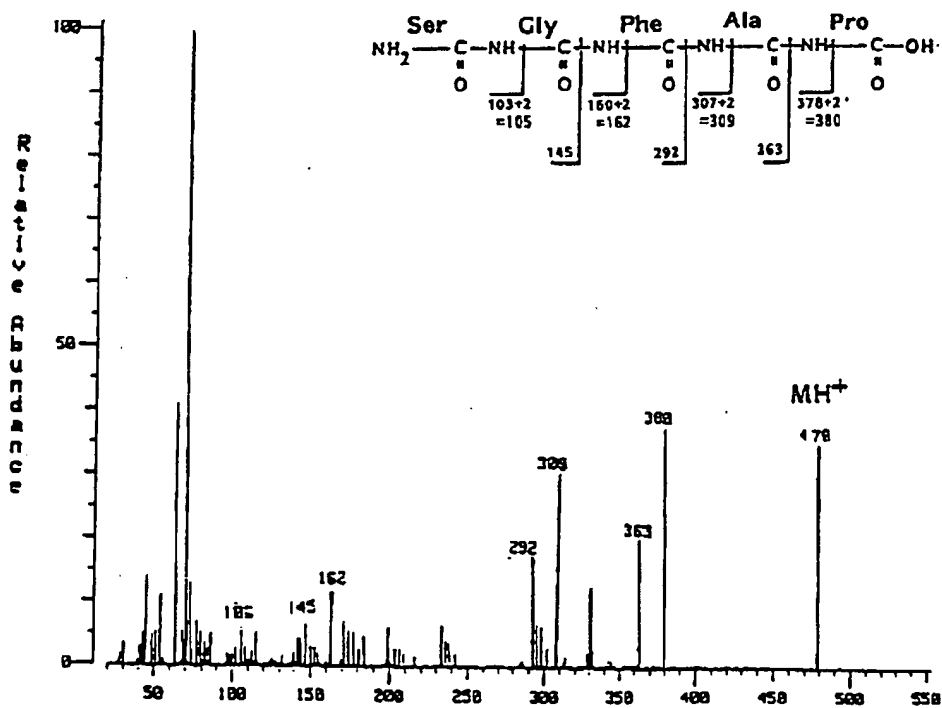
【図9】

Val-Ile-Pro-Pro-Gly-Val-Pro-Tyrのマスペクトル



【図11】

Ser-Gly-Phe-Ala-Proのマスペクトル



【図10】

Glu-Gln-Gln-Gly-Lys-Gly-Ileのマスペクトル

